

국소 대뇌 허혈 및 재관류 후 생쥐 모델에서 활성 산소 제거제(MnTBAP)에 의한 Endonuclease G의 조기 핵 내 이동방지 및 뇌경색 감소

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 뇌 연구소

김현우 조경주 김현정 조양제 이병인 김경환

Treatment with MnTBAP Protects Against Early Nuclear Translocation of Endonuclease G and Reduces Cerebral Infarction after Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion in Mice

Hyun-Woo Kim, B.S., Kyoung-Joo Cho, M.S., Hyun-Jeong Kim, M.S., Yang-Je Cho, M.D.,
Byung-In Lee, M.D., Gyung-Whan Kim, M.D.

Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, Brain Research Institute

Background: Reactive Oxygen Species (ROS) have been implicated in the pathophysiology of brain injury after ischemia/reperfusion. Recently, it has been reported that endonuclease G (EndoG), a mitochondrial protein, is activated by neuronal excitotoxicity and translocated into nucleus inducing apoptosis. However, it is not elucidated whether ROS are involved in the nuclear translocation of EndoG in focal cerebral ischemia/reperfusion in mice. We investigated whether treatment of manganese tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP) protects against early nuclear translocation of EndoG and reduces cerebral infarction after ischemia/reperfusion in mice.

Methods: Adult male mice were subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 60 min, followed by reperfusion. Immunohistochemistry and Western blot analysis for EndoG were performed at various time points after ischemia/reperfusion. Double staining with EndoG and Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end-labeling (TUNEL) was also performed. MnTBAP was used to determine whether the production of ROS could inhibit translocation of EndoG into the nucleus.

Results: Western blot analysis and Immunohistochemistry of EndoG showed that nuclear EndoG was detected as early as 4 hrs after reperfusion, and mitochondrial EndoG was significantly reduced at the same time. Double staining with EndoG and TUNEL showed a spatial relationship between EndoG expression and DNA fragmentation. MnTBAP-treated mice showed that the translocation of EndoG was attenuated in comparison with the vehicle-treated mice and decreased infarction volume after ischemia/reperfusion.

Conclusions: MnTBAP reduced the generation of ROS, and inhibited the early translocation of EndoG, which was followed by the reduction of infarction volume in the ischemic brain after ischemia/reperfusion.

J Korean Neurol Assoc 25(4):535-543, 2007

Key Words: Endonuclease G, DNA fragmentation, Transient focal cerebral ischemia, MnTBAP

Received April 9, 2007 Accepted July 6, 2007

* Gyung-Whan Kim, M.D.

Department of Neurology College of Medicine Yonsei University,
134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul, 120-752 Korea

Tel: +82-2-2228-1609 Fax: +82-2-393-0705

E-mail: gyungkim@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 2006년 연세대학교 의과대학 교내연구비 (6-2006-0036)와 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2006-312-E00127)을 받아 수행된 연구임.

서 론

뇌졸중은 많은 나라에서 주요 사망 원인의 하나로 알려져 있으며, 국내에서도 전체 사망 원인 2위, 단일 장기 질환으로는 사망 원인 1위로 사망률이 높은 질환이다. 한국 사회가 점차 고령화되면서 뇌졸중 발생 빈도의 증가에 따른 사회경제적인 부담이 높아지게 될 것으로 예상된 바 뇌졸중의 사망 위험을

낮추는 인자를 찾아내는 등 치료 방법 개발이 매우 절실히 요구되고 있다.¹

과도하게 생성된 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)에 의한 스트레스는 대뇌 허혈 및 재관류 후 직접적으로 세포 손상을 입히거나 간접적 신호전달체계를 통해 세포 손상을 가져옴으로써, 뇌졸중을 포함한 여러 중추신경계 질환에서 병인론적으로 중요한 역할을 한다.^{2,3} 생쥐의 허혈 및 재관류 모델 실험에서 재관류 중 재공급된 산소는 다양한 효소의 산화반응을 야기하는 생화학적 기질을 생성하며, 미토콘드리아에서 과산화 음이온(superoxide anion)과 과산화수소(hydrogen peroxide)와 같은 활성 산소종을 발생시킨다고 알려졌다.^{2,3} 이러한 활성 산소종은 세포고사(apoptosis) 신호전달경로의 활성화에 관여하며 대뇌 허혈 및 재관류의 중요한 병태생리 기전으로 알려져 있다.^{2,4-6}

대뇌 허혈 이후에 발생하는 세포고사에서 caspase 의존성 세포고사 경로의 중요성은 잘 알려져 왔으며, caspase 의존성 세포고사 유도 물질 중 대표적인 것이 미토콘드리아 내에 존재하는 cytochrome c이다. 이로 인한 caspase 활성화는 대뇌 허혈 및 재관류 이후에 발생하는 세포고사에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 왔다.^{7,8} 하지만 배양된 Rat-1 섬유아 세포에 caspase를 억제함과 동시에 AIF (Apoptosis-Inducing Factor)를 미세 주사한 후의 연구 보고에서 caspase가 억제되었음에도 불구하고 세포고사가 일어나는 현상으로 인해 caspase 비 의존성 대체 경로가 존재할 것이라는 가능성이 발표되었으며,⁹ 본 연구팀의 이전 연구^{10,11}에서 밝힌 바, 생쥐를 대상으로 한 국소 대뇌 허혈모델에서 AIF가 핵 내로 이동하여 caspase 비 의존성 세포고사를 일으키며 활성산소 제거제에 의해 세포고사가 방지되었다. 위와 같은 연구 결과들로 뇌경색 후 발생하는 세포고사에 caspase 비 의존성 세포고사 물질이 중요한 인자로 대두되고 있다.

또 다른 caspase 비 의존성 세포고사 물질로서, 사립체 세포고사 유도 물질인 Endonuclease G (EndoG)가 최근 새로이 주목받고 있는데,¹²⁻¹⁵ 미토콘드리아 막 사이(intermembrane) 공간에서 핵 내로 이동한 EndoG는 먼저 50 kbp의 대단위(large-scale) DNA 분절을 만든 다음, 순차적 세포고사 과정을 통해 소단위(oligonucleosomal) DNA 분절을 만든다.^{13,16} 이러한 EndoG의 작용은 exonuclease나 DNase I 등의 존재에 의해 촉진되는 것으로 보고되고 있다.¹⁶ 이 보고는 신경세포고사를 유도하는 데 EndoG가 핵심 역할을 할 것이라는 가설을 강력하게 뒷받침한다. 산화적 스트레스로 인한 척추 손상 모델에서 SOD1 과발현 랫드의 EndoG의 핵 내 이동과 그로 인한 세포사멸이 활성 산소종과 관련되어 있다는 보고가 있으나,¹⁷ 국

소 대뇌 허혈 및 재관류 유도 후 활성 산소종이 과생성된 환경에서의 EndoG와 활성 산소종 제거제와의 역할 및 연관성에 대해서는 아직 확실히 규명되어 있지 않다.

이에 본 연구에서는 국소 대뇌 허혈 및 재관류 생쥐 모델에서 활성 산소종과 EndoG의 핵 내 이동과의 관계를 확인하고자 하였다. 이를 위해 활성 산소종 제거제인 Manganese tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP)를 사용하여 EndoG의 핵 내 이동방지 여부를 확인하고 이를 통한 대뇌 허혈부위 세포의 DNA 분절현상 감소 여부와 뇌경색 병변 크기의 변화를 확인하고자 하였다.

대상과 방법

1. 일과성 대뇌 국소허혈 모델

본 실험에서 모든 실험동물 연구 방법은 연세 의과대학 실험동물위원회의 지침을 준수하였으며, Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)의 승인을 받았다. 수컷 성체 C57BL/6J 마우스(3개월령, 25-30 g) (Daehan Biolink Co., Chunbuk, South Korea)를 나일론 봉합사를 이용해 한시적으로 중대뇌동맥을 폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO)함으로써 일과성 국소 허혈 모델을 적용하였다.¹⁸⁻²⁰ 안면 마스크를 사용하여 2% isoflurane과 함께 질소와 산소 혼합기체(70%/30%)로 마우스를 마취시켰고, 체온은 heating pad 및 lamp로 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 정중경부를 절개하여 외경동맥을 노출시킨 후, 열처리로 끝을 무디게 만든 9.0 mm 길이의 5-0 수술용 나일론 봉합사(Ethicon, Edinburg, UK)를 외경동맥을 통해 내경동맥으로 삽입하여 중대뇌동맥 혈류를 차단하였으며, 60분 후에 나일론을 제거하여 혈류를 회복시켰다. 이때 중대뇌동맥의 혈류 폐색여부는 Laser Doppler Flowmeter (Transonic Systems Inc., Ithaca NY 14850, USA)를 사용하였다.

2. EndoG 검출을 위한 Western blot analysis

조직은 50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 3 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Triton X-100 및 각각 5 mg/ml의 leupeptin, pepstatin A와 aprotinin (Sigma, St Louis, MO, USA)이 첨가된 차가운 균질화 완충액에서 균질화시켰다. 미토콘드리아/세포질 층을 4°C 에서 10분 동안 $750 \times g$ 로 원심 분리한 후 그 침전물을 다시

4℃에서 15분 동안 1,025×g로 원심 분리하였다. 핵이 포함된 침전물을 얼음에서 15분 동안 둔 다음, 완충액으로 재부유시켜 4℃에서 20분 동안 16,000×g로 원심 분리하여 핵 분획으로 사용하였다. 미토콘드리아 침전물을 얻기 위해 상층액을 4℃에서 15분간 10,000×g로 원심 분리한 후, 미토콘드리아 침전물을 3% Ficoll 용액(120 mM mannitol, 30 mM sucrose, 25 M EDTA)에 녹이고, 6% Ficoll 용액(240 mM mannitol, 60 mM sucrose, 50 M EDTA)으로 농도구배 후, 다시 상층액을 채취하여 4℃에서 25분 동안 16,000×g로 원심 분리하여 미토콘드리아 분획으로 사용하였다.^{21,22} EndoG 다클론성 항체(1:1000; Oncogene Science, Cambridge, MA, USA)를 가한 후, 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후 0.1% Tween 20이 포함된 TBS로 막을 15분간 다섯 차례 세척하고, 이차 항체인 horse radish peroxidase가 부착된 anti-rabbit IgG (1:5000; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)를 37℃에서 60분간 반응시킨 후, chemiluminescence detection system인 ECL plus kit (Amersham International, Buckinghamshire, England)로 발색시켰다.

3. 면역조직화염색을 통한 EndoG 발현 확인

EndoG 분석을 위한 면역조직화염색은 avidin-biotin 방법을 채택하였다.²³ Urethane으로 마취시킨 생쥐를 10 U/ml 헤파린이 첨가된 0.9% 생리식염수와 3.7% 포르말데히드로 관류시켜, 조직을 준비하였다. 뇌를 적출하여 3.7% 포르말데히드로 16시간 동안 후 고정을 시키고, 사용할 때까지 30% sucrose에 저장하였다. 뇌조직을 드라이 아이스에서 열린 후 cryostat section을 이용해, 20 μm 두께로 관상(coronal) 절편을 만들었다. 절편을 실온에서 1시간 동안 20%의 rabbit serum으로 blocking시킨 다음, 일차 항체로 rabbit anti-EndoG 다클론성 항체(1:50; Oncogene Science)를 반응시켰다. Vectastatin Elite ABC Kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 면역반응을 시행하였고 diaminobenzidine (DAB; Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 발색시켰으며, methyl green으로 핵 대조염색을 실시하였다. EndoG 양성세포와 methyl green 양성세포를 고배율(400x)에서 계수한 다음, EndoG 양성세포의 비로 표시하였다.¹⁹

4. MnTBAP 처리

생성된 과산화물 제거를 위해 50 μg/μl의 MnTBAP를 MCAO 30분 전에 뇌실 내로 주입하였다(2 μl, mediolateral=1.0 mm;

anteroposterior=0.2 mm; dorsoventral=3.1 mm). 실험군은 MnTBAP를 주입하고 대조군은 vehicle(증류수)을 주입하였다.

5. *in situ* 과산화 음이온 라디칼 검출

허혈 후 발생하는 과산화 음이온을 확인하기 위해 oxidized hydroethidine (HEt) 검출법을 사용하였다.²⁴ HEt (Molecular Probes)를 dimethylsulfoxide (DMSO)에 100 mg/mL로 용해시킨 후 PBS완충액으로 1:100 비율로 희석시켰다. C57BL/6J 마우스를 희생시키기 1시간 전에 200 μl HEt을 정맥 내에 주입하고 심장을 통해 10 U/mL 헤파린이 첨가된 생리식염수와 3.7% 포르말데히드로 관류한 후 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌를 3.7% formaldehyde로 16시간 동안 4℃에서 고정시킨 다음 vibratome을 사용하여 50 μm의 두께로 절편을 만들었다. 조직 절편이 준비된 즉시 뇌 절편을 유리판 위에 올리고 현미경으로 관찰하였다. 핵 대조염색은 Hoechst 33258 (Molecular Probes)을 사용하였다. Oxidized HEt의 발현 강도와 패턴 분석을 위해 computerized digital camera system 형광 현미경(Ex=510–550 nm, Em>580 nm; BX51, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하였고 이미지 분석 프로그램으로 분석하였다(MetaMorpho imaging, version 5.0; Molecular devices, Downingtown, PA, USA).

6. EndoG와 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end-labeling (TUNEL) 이중면역형광염색

EndoG와 DNA 분절현상이 동일 위치에 발현하는지를 확인하기 위해 이중면역형광염색을 시행하였다. 상기 방법으로 EndoG 면역조직화염색을 시행한 후, PBS로 세척하고 절편을 50 μl의 TUNEL fluorescent 반응 혼합액(terminal deoxy-nucleotidyl transferase and fluorescein-dUTP; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)과 37℃의 어두운 곳에서 60분 동안 반응시킨 후, Vectashield (Vector laboratories)로 봉입하고 LSM510 confocal laser scanning 현미경 (Carl Zeiss)으로 관찰하여 분석하였다.

7. 뇌경색 크기 측정

증류수 투여군과 MnTBAP 투여군으로 나누어 비교하였으며, 투여 15분 후에 MCAO를 시행하여 일과성 국소허혈을 유도하였다. 국소대뇌허혈 후, 24시간째에 마우스를 희생시켜 뇌를 적출

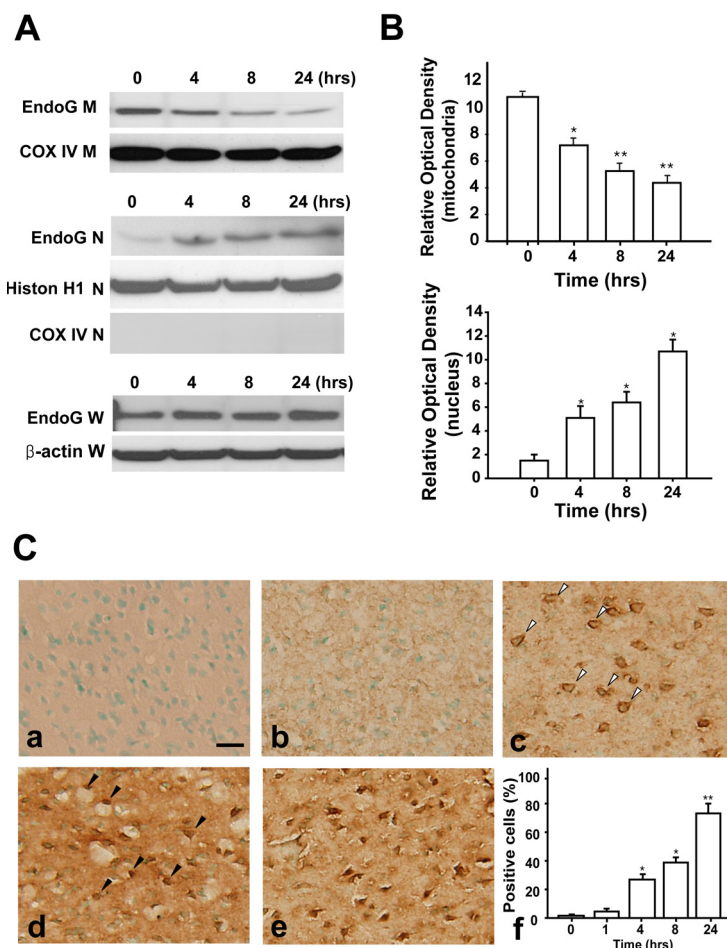


Figure 1. Western blot analysis and Immunohistochemistry of EndoG. (A) EndoG is detected in subcellular fractionation by Western blot analysis. EndoG is time-dependently translocated from the mitochondrial fraction to the nuclear fraction after ischemia/reperfusion. (B) The quantitative graphs show the optical density values of EndoG in the mitochondrial and nuclear fractions respectively. COX, cytochrome oxidase; M, mitochondrial fraction; N, nuclear fraction. (C) EndoG is also detected by immunohistochemistry in a time-dependent manner. EndoG is started to appear in cytosol region and showed in nucleus region at 24 hrs after ischemia/reperfusion. a-b) EndoG is not detected in control and 1 hr c-e) Nuclear staining of EndoG became prominent at 4, 8, and 24 hrs after ischemia/reperfusion. f) The percentage of EndoG-positive cells is shown in graph. Scale bar = 20 μ m * p <0.05, ** p <0.01.

하였다. 적출한 뇌는 brain matrix를 이용하여 전두부부터 1 mm 두께로 잘라 관상 절편화하였다. 각각의 절편을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)에 담가 37°C에서 15분간 배양하여 염색하였으며,¹⁸ 평판 스캐너를 이용하여 1200 dpi로 스캔하였다.

8. 통계학적 분석

데이터들은 mean \pm SD로 표현하였다. 여러 집단 간의 통계학적 비교는 ANOVA (with Fischer's post-hoc test)를 사용

하였고, 두 집단 간의 차이는 t test를 통해 분석했으며(Stat-View; SAS Institute Inc, Cary, NC, USA), p <0.05를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 허혈/재관류 동안 중대뇌동맥의 혈류량변화

중대뇌동맥의 혈류량은 중대뇌동맥 폐색 10분 전, 폐색 10분 후 그리고 재관류 10분 후에 수치를 측정하였으며, 세 군

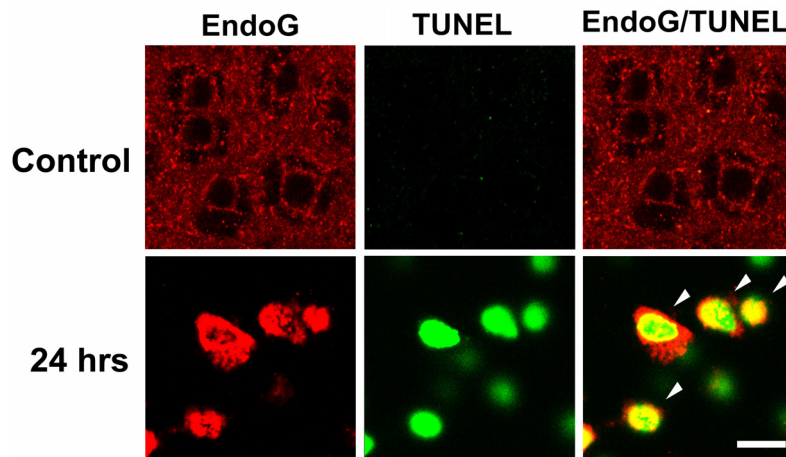


Figure 2. DNA fragmentation after ischemia/reperfusion. Immunofluorescent double-staining was performed for EndoG and TUNEL. EndoG is mostly colocalized with TUNEL at 24 hrs after ischemia/reperfusion. EndoG in control group is exclusively detected in the cytosol by confocal microscopy. In contrast, EndoG is colocalized with TUNEL (arrow heads) in the nucleus at 24 hrs after ischemia/reperfusion. Scale bar = 10 μ m.

간의 유의적 차이는 없었다(%: 폐색 10분 전, 100 ± 0 , 폐색 10분 후, 20.6 ± 14.1 , 재관류 10분 후, 96.6 ± 9.4 , $n=13$, mean \pm SD).

2. Western blot 분석에서 EndoG의 핵 내 발현증가

Western blot을 이용하여, EndoG의 시간에 따른 발현 변화 양상을 관찰하였는데, 허혈 및 재관류 이후 허혈 뇌조직에서 ~ 35 kDa 분자량의 단백질이 미토콘드리아와 핵 분획에서 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 1-A). Figure 1-B에서 보이듯이 많은 양의 EndoG가 정상 뇌조직의 미토콘드리아 분획에서도 관찰되었으며, 허혈 및 재관류 후 시간이 지남에 따라 통계적으로 유의한 감소를 보였다(optical density (O.D.). : 0 hr, 10.0 ± 0.19 ; 4 hrs, 7.1 ± 0.53 ; 8 hrs, 5.6 ± 0.38 ; 24 hrs, 4.4 ± 0.56 ; $n=5$, ANOVA, $p < 0.01$). 동일 뇌조직의 핵 분획을 조사하였는데, 허혈 및 재관류 후 시간이 지남에 따라 미토콘드리아 EndoG의 면역 반응이 감소하는 것과는 대조적으로 시간에 따른 핵 내 EndoG의 면역 반응은 정상 뇌조직에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보였다(OD: 0 hr, 1.5 ± 0.5 ; 4 hrs, 5.1 ± 1.0 ; 8 hrs, 6.4 ± 0.9 ; 24 hrs, 10.7 ± 1.0 ; $n=5$, ANOVA, $p < 0.01$) (Fig. 1-B).

3. 면역조직화학염색에서의 EndoG의 핵 내 발현 증가

면역조직화학염색을 이용하여, 허혈 및 재관류 이후 EndoG의 발현을 조사하였다(Fig. 1). 일차 항체를 제외하고 처리한 조

직에서는 면역 반응이 전혀 관찰되지 않았고(data not shown), 정상 뇌조직(Fig. 1-Ca)과 허혈 및 재관류 1시간 후에 허혈 뇌조직(Fig. 1-Cb)에서는 EndoG 면역 반응이 거의 관찰되지 않았다. 반면 허혈 및 재관류 4시간째부터 허혈 뇌조직에서는 핵 내 EndoG의 면역 반응이 나타났고(Fig. 1-Cc: open arrow heads), 세포질에도 역시 EndoG의 면역 반응이 관찰되었다. 그러나 이러한 면역 반응에 양성을 보인 세포들은 형태학적으로는 아직 특이사항이 관찰되지 않았다(Fig. 1-Cc). 허혈 및 재관류 후 8시간째부터 EndoG에 대한 핵 내 양성 반응이 점점 증가하였고(Fig. 1-Ad, black arrow heads), 24시간째에는 형태학적으로 허혈성 변화를 보이는 거의 모든 신경세포 핵에서 EndoG에 대한 양성 반응이 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 1-Ce). Figure 1-Cf는 단위면적당 전체 세포에 대한 EndoG 양성 세포의 수를 백분율로 표시한 그래프이며, 허혈 및 재관류 이후 24 시간까지 핵 내 EndoG의 발현량은 시간이 지남에 따라 증가함을 확인할 수 있었다(1 hr, 7.2 ± 0.3 ; 4 hrs, 26 ± 0.5 ; 8 hrs, 38 ± 0.8 ; 24 hrs, 74 ± 0.9 , the percentages of nuclear EndoG-positive cells, $n=4$) (Fig. 1-Cf).

4. EndoG와 TUNEL 이중면역형광염색

EndoG와 TUNEL 이중면역형광염색을 통해, 허혈 및 재관류 24시간 후 조직에서 핵 내 EndoG 양성 세포와 TUNEL 양성 세포가 일치하여 나타나는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 2), 반면 대조군인 반대쪽 정상 뇌세포에서는 EndoG 양성 세포와 TUNEL 양성세포도 관찰되지 않았다.

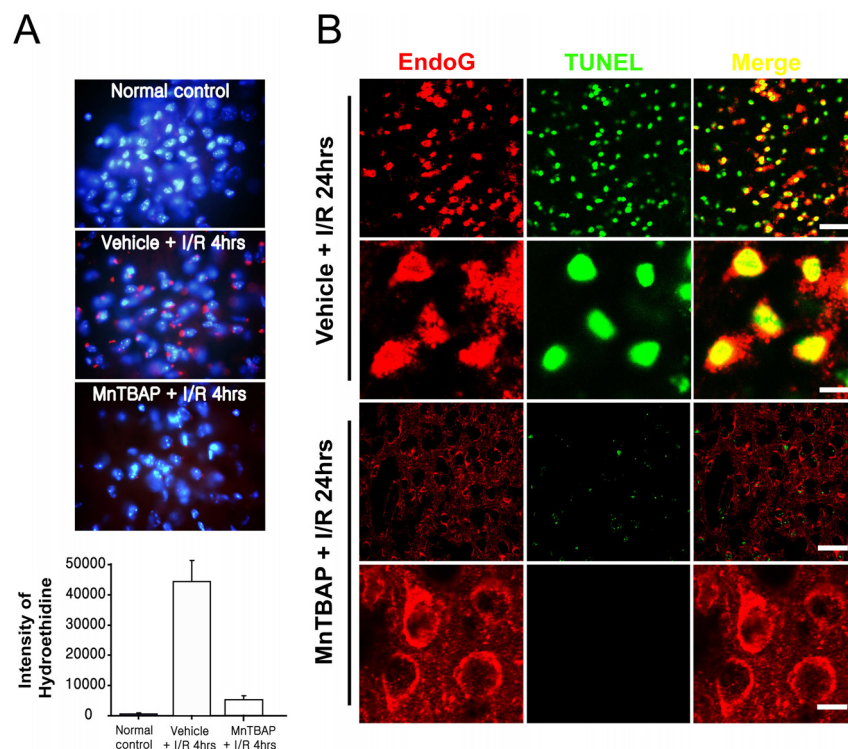


Figure 3. The effect of MnTBAP on ROS production and on an apoptotic cell death. (A) The representative photomicrographs show the production of superoxide radicals by the detection of oxidized HET in both the MnTBAP- and vehicle-treated mouse brain at 4 hrs after ischemia/reperfusion. Oxidized HET signals express in red spots at perinuclear sites and profound increase of oxidized HET signals in the cytosol are observed in the ischemic brain of vehicle-treated mice. In MnTBAP-treated mice, oxidized HET signals are observed slightly increased cytosolic expression in contrast to the vehicle-treated mice. The lowest panel shows quantified values of HET signals. MnTBAP, manganese tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin; HET, hydroethidine. Scale bar = 10 μ m. (B) Inhibition against translocation of EndoG and cell death after MnTBAP treatment. EndoG expression was compared in the MnTBAP- and vehicle-treated mice at 24 hrs after ischemia/reperfusion by Immunohistochemistry and EndoG nuclear translocation was decreased in MnTBAP treated group. Lower panels of vehicle- and MnTBAP-treated group in higher magnification. Scale bar, 50 μ m (lower magnification); 10 μ m (higher magnification).

5. MnTBAP 처리군에서의 과산화 음이온 생산의 억제

과산화 음이온은 세포질에서 산화된 hydroethidine이 빨간 입자 형태로 관찰되는데(Fig. 3), 일시적 허혈 유도 후 4시간 상태에서 vehicle 처리군의 허혈 부위에서는 산화된 hydroethidine이 정상 대조군(Fig. 3, Normal control)과 비교 시 현저히 증가된 반면(Fig. 3, Vehicle+ I/R 4 hrs), MnTBAP를 처리한 군(Fig. 3, MnTBAP+ I/R 4 hrs)의 병변 부위 산화 hydroethidine는 정상 부위에 비해 별로 증가하지 않아 MnTBAP 처리군과 vehicle 처리군 사이에 의미 있는 차이를 보였다(normal control, 50.82 ± 8.6 ; vehicle+I/R 4 hrs, 44409.52 ± 6869.8 ; MnTBAP+I/R 4 hrs, 31425.56 ± 7974.4 ;

mean \pm SD, $n=5$, ANOVA, $p<0.01$).

6. MnTBAP 처리군에서의 EndoG의 핵 내 이동 감소와 세포고사 및 뇌경색 감소

일시적 허혈 유도 24시간 후에, MnTBAP 처리군과 vehicle 처리군(Fig. 3)에서 면역조직화학염색과 TUNEL을 통해 EndoG 단백질 발현과 세포고사를 비교하였다. MnTBAP 처리군에서는 EndoG 핵 내 이동이 vehicle 처리군(Fig. 3, Vehicle+ I/R 24 hrs)에 비해 현저히 감소하였으며, 세포고사를 나타내는 TUNEL 양성 세포는 발견되지 않았다(Fig. 3, MnTBAP+ I/R 24 hrs). 대조군인 정상 뇌조직에서의 EndoG 핵 내 이동은 MnTBAP 처

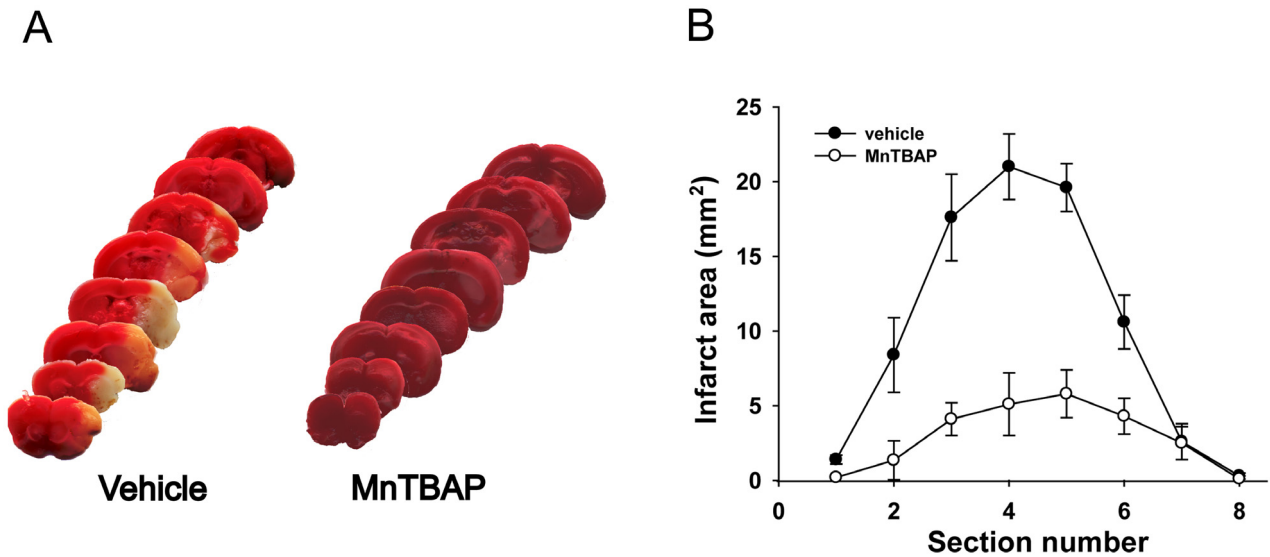


Figure 4. The comparison of infarction area between vehicle- or MnTBAP-treated mice. (A) Scanned representative images of an entire TTC were stained in ischemic brain sections. The infarcted areas remain unstained (white). (B) The graph represents quantified infarction area in two groups.

리군과 vehicle 처리군 모두에서 발견되지 않았다(data not shown). TTC 염색을 통해서 각 군간의 병변의 크기를 비교한 결과 MnTBAP 처리군이 vehicle을 처리한 군보다 병변의 크기가 작았다(Fig. 4).

고 찰

이번 연구를 통해 국소 대뇌 허혈 및 재관류 이후 이른 시기에 EndoG가 미토콘드리아에서 핵 내로 이동하여 DNA분절을 유도하며 뇌경색에 이르게 하는 것을 밝혔으며, 활성 산소 제거제인 MnTBAP에 의한 활성 산소종 제거를 통하여 EndoG의 핵 내 이동 및 뇌경색을 방지함을 입증하였다. 본 연구의 결과를 요약하면, 첫째, 미토콘드리아 분획 내 EndoG의 양은 국소 대뇌 허혈 및 재관류 후 4시간이 경과된 시점에서부터 감소하기 시작하였으며, 핵 분획 내 EndoG의 양은 미토콘드리아 분획에서의 감소 시점부터 유의하게 증가하였음을 보여주었다(Fig. 1). 또한 24시간 후에 DNA 손상을 의미하는 TUNEL 양성 세포가 핵 내 EndoG 양성세포와 일치하여 나타나는 것을 보여주었다(Fig. 2). 둘째, MnTBAP를 처리한 군에서 국소 대뇌 허혈 및 재관류로 인한 과산화 음이온의 생산이 감소됨을 oxidized hydroethidine 감소를 통해 확인하였다(Fig. 3). 셋째, 활성 산소 제거제인 MnTBAP를 처리한 군에서 허혈 및 재관류 후 EndoG의 핵 내 이동은 vehicle 처리군보다 유의하게 감소하였

으며 뇌경색의 크기가 감소하였음을 확인하였다(Fig. 3, 4). 이는 과도하게 발생한 과산화 음이온과 같은 활성 산소종이 EndoG의 핵 내 이동을 유도하며, 최종적으로는 활성 산소종을 제거함으로써 뇌경색을 감소시킬 수 있음을 시사한다.

이번 실험에서 EndoG가 생쥐 대뇌의 허혈 및 재관류 유도 후, 4시간 만에 미토콘드리아에서 감소하고 핵 내에서 증가함을 Western blot 분석과 면역조직화학염색(Fig. 1)을 통해 명확하게 보여줌으로써 국소 대뇌 허혈 및 재관류 이후 EndoG의 조기 핵 내 이동이 일어남을 증명하였는데, 이는 정상 세포고사 과정에서 EndoG의 조기 핵 내 이동이 일어난다는 *in vitro* 실험들^{13,25,26}과도 잘 부합하는 것이다.

또한 본 결과는 국소 대뇌 허혈 및 재관류 후 24시간째에 EndoG가 핵 내로 이동된 세포에서 TUNEL 양성 세포가 나타남을 EndoG와 TUNEL의 이중면역형광염색을 통해 확인하였다(Fig. 2). 이는 EndoG가 핵 내 이동 후 세포고사를 유도한다는 것을 보여줄 뿐만 아니라, 세포고사 메커니즘에 EndoG가 관여함을 보여주는 하나의 단서를 제공해 준다. 최근 뇌허혈을 일으키는 세포흥분독성(excitotoxicity) 유발제인 kainic acid 처리 모델 연구에서, 야생형 생쥐에 비해 EndoG 결핍(knockout) 생쥐의 EndoG 핵 내 이동이 감소되었음을 보였고, 뇌허혈 흥분독성에 대한 방어 효과가 있다는 보고는²⁷ EndoG가 핵 내 이동 후 세포고사를 유도한다는 본 연구의 가설을 뒷받침 해 준다.

특히 활성 산소 제거제인 MnTBAP가 허혈 및 재관류 후에

과발현한 과산화 음이온을 제거하여 EndoG의 핵 내 이동을 상당히 억제하였으며, 동시에 세포고사성 DNA 손상 지표인 TUNEL 양성 세포가 줄어들었음을 보여주었는데(Fig. 3), 이는 human pulmonary artery endothelial cells 배양 연구²⁸와 3-amino-1,2,4-triazole+mercaptosuccinic acid에 의해 유도된 쥐 간세포 사멸 연구²⁹ 등과 같은 *in vitro* 실험에서 제시한 EndoG의 핵 내 이동이 활성 산소종에 의해 유도된다는 사실과 부합한다. 또한 배양된 망막세포와 신경세포에 항산화제인 비타민 E와 아이디비논(Idebenone) 처리 후 효과를 보고한 연구와³⁰ 형질전환된 쥐에서 전사 인자인 Nrf2의 항산화적 효과에 관한 보고 등³¹에서 보여주는 것과 같이 과도한 활성 산소종에 의한 손상을 치료하기 위한 연구들이 이루어지고 있다. 또한 활성 산소 제거 효소인 SOD1 (Copper/Zinc Superoxide Dismutase)이 과발현된 생쥐 및 랫드 연구에서는 허혈 및 재관류 후 과도한 산화적 스트레스에 의한 대뇌 손상 후 뇌손상 보호에 효과가 있음이 보고되었는데,^{8,32} 이는 본 연구에서 MnTBAP 처리 여부에 따른 뇌경색 크기를 비교한 결과, MnTBAP 처리군에서 뇌경색 감소에 효과가 있으며(Fig. 4) 활성 산소종 제거가 뇌경색에 치료적 효과가 있음을 뒷받침해 준다.

결론적으로 본 연구결과는 국소 허혈 및 재관류 이후 EndoG의 초기 핵 내 이동 이후 세포고사가 일어났으며, 활성 산소 제거제인 MnTBAP를 투여하여 활성 산소종을 제거하면, EndoG의 핵 내 이동이 차단되며, 세포고사 및 뇌경색이 현저히 감소함을 보였다. 다만 EndoG가 세포고사 과정에서 작용하는 정확한 기전과 MnTBAP에 의한 과산화 음이온 억제에 따른 EndoG의 핵 내 이동방지 기전에 대한 연구가 좀 더 이루어진다면, 향후 뇌경색을 비롯한 여러 뇌신경 질환을 이해하고 치료하는 데 도움이 될 것이다.

REFERENCES

1. Korea National Statistical Office. Cause of death Statistics. www.nso.go.kr
2. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:2-14.
3. Chan PH. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* 1994;4:59-65.
4. Kim GW, Sugawara T, Chan PH. Involvement of oxidative stress and caspase-3 in cortical infarction after photothrombotic ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1690-1701.
5. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Copin JC, Calagui B, Epstein CJ, et al. Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 1999;19:3414-3422.
6. Murakami K, Kondo T, Kawase M, Li Y, Sato S, Chen SF, et al. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci* 1998;18:205-213.
7. Schulz JB, Weller M, Moskowitz MA. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 1999;45:421-429.
8. Sugawara T, Noshita N, Lewen A, Gasche Y, Ferrand-Drake M, Fujimura M, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci* 2002;22:209-217.
9. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-446.
10. Cho YJ, Lee YH, Cho KJ, Lee DJ, Kim HW, Kim HJ, et al. Nuclear translocation of apoptosis inducing factor and subsequent DNA fragmentation by reactive oxygen species after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Korean J Stroke* 2005;7:214-223.
11. Lee BI, Chan PH, Kim GW. Metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimic attenuates the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and the subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2005;36:2712-2717.
12. Lee BI, Lee DJ, Cho KJ, Kim GW. Early nuclear translocation of endonuclease G and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett* 2005;386:23-27.
13. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412:95-99.
14. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004;23:2861-2874.
15. Schafer P, Scholz SR, Gimadutdinov O, Cymerman IA, Bujnicki JM, Ruiz-Carrillo A, et al. Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J Mol Biol* 2004;338:217-228.
16. Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem* 2001;276:48404-48409.
17. Yu F, Sugawara T, Nishi T, Liu J, Chan PH. Overexpression of SOD1 in transgenic rats attenuates nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2006;23:595-603.
18. Kim GW, Kondo T, Noshita N, Chan PH. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 2002;33:809-815.
19. Kim GW, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Early decrease in dna repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2001;32:1401-1407.
20. Tsuchiya D, Hong S, Kayama T, Panter SS, Weinstein PR. Effect of suture size and carotid clip application upon blood flow and infarct volume after permanent and temporary middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res* 2003;970:131-139.
21. Zhu C, Qiu L, Wang X, Hallin U, Cande C, Kroemer G, et al. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 2003;86:

- 306-317.
22. Cao G, Clark RS, Pei W, Yin W, Zhang F, Sun FY, et al. Translocation of apoptosis-inducing factor in vulnerable neurons after transient cerebral ischemia and in neuronal cultures after oxygen-glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:1137-1150.
23. Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci* 2003;23:8733-8742.
24. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* 2003;22:4385-4399.
25. Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 2001;412:90-94.
26. Zhang J, Dong M, Li L, Fan Y, Pathre P, Dong J, et al. Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15782-15787.
27. Wu Y, Dong M, Toepfer NJ, Fan Y, Xu M, Zhang J. Role of endonuclease G in neuronal excitotoxicity in mice. *Neurosci Lett* 2004;364:203-207.
28. Liu PL, Chen YL, Chen YH, Lin SJ, Kou YR. Wood smoke extract induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in human lung endothelial cells: role of AIF and EndoG. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L739-749.
29. Ishihara Y, Shimamoto N. Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress. *J Biol Chem* 2006;281:6726-6733.
30. Rego AC, Santos MS, Oliveira CR. Influence of the antioxidants vitamin E and idebenone on retinal cell injury mediated by chemical ischemia, hypoglycemia, or oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1405-1417.
31. Shih AY, Li P, Murphy TH. A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. *J Neurosci* 2005;25:10321-10335.
32. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Sugawara T, Kawase M, Chan PH. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 2000;20:2817-2824.